



Università degli Studi di Verona
Scuola di Medicina e Chirurgia
Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina e Chirurgia
Anno Accademico 2016-2017

Genetica e Biologia molecolare

Coordinatore Prof. A. Turco

Crediti totali: 15
Crediti modulo: 6

Docente
Dott. Donato Zipeto

Ore lezioni frontali 48
Anno di corso II
Semestre I

Biologia molecolare

CORE CURRICULUM

Obiettivi del corso

Far comprendere allo studente di Medicina i processi fondamentali della scienza del DNA e del flusso dell'informazione che porta dal DNA all'RNA alle proteine.

Far comprendere i meccanismi di funzionamento e di regolazione di questi processi.

Educare lo studente al metodo scientifico, mediante descrizione di esperimenti che hanno permesso di delucidare i meccanismi biologici molecolari.

Acquisire la comprensione delle tecnologie del DNA ricombinante e delle potenzialità da esse offerte.

Programma Didattico

- Struttura e Conformazioni del DNA
- Complessità del DNA genomico
- Struttura del DNA nei cromosomi
- Replicazione del DNA
- Riparazione del DNA
- Ricombinazione
- Trascrizione nei procarioti e negli eucarioti
- Maturazione dell'RNA
- Codice Genetico
- Traduzione
- Regolazione dell'espressione genica nei procarioti
- Regolazione dell'espressione genica negli eucarioti
- Maturazione, trasporto e destinazione delle proteine
- DNA ricombinante e Tecnologie del DNA ricombinante
- Evoluzione molecolare
- Cenni di terapia genica



Programma Dettagliato

Struttura e Conformazioni del DNA

Struttura del DNA Caratteristiche del DNA Dimensioni delle diverse forme di DNA Tipi di legame e solchi nel DNA DNA lineare, circolare e superavvolto. Nucleoide batterico Cromatina. Proteine e geni istonici. Nucleosoma. Fibra a 10 nm e a 30 nm. Valori di impaccamento Anse. Impalcatura metafasica. Impaccamento del DNA negli spermatozoi.

2. Complessità del DNA genomico

Gene come unità codificante. Organizzazione genica. Genoma umano. Sequenze geniche e correlate ai geni. Elementi ripetuti intergenici. DNA satellite. Complessità genomica. Dimensioni genomi di altri organismi. Numero geni in eucarioti. Famiglie di geni. Geni ed evoluzione.

Replicazione del DNA

Ipotesi di Watson e Crick. Origine della replicazione in batteri ed eucarioti. Bolla replicativa. Reazione di polimerizzazione DNA (4.04). Tipi di stampo-innesco. Attività polimerizzante e autocorrettiva. Forcella replicativa. Filamenti guida e ritardato DNA primasi. DNA elicasi. DNA topoisomerasi I e II. Proteine SSB. Pinza scorrevole e posizionatore. DNA ligasi. Replicazione DNA mitocondriale. Telomerasi. Replicazione dei telomeri. Meccanismi di replicazione virale: adenovirus, herpesvirus, retrovirus, influenza, coronavirus.

Riparazione del DNA

Alterazioni delle basi. Punti reattivi sul DNA. Danni spontanei. Depurinazione. Deaminazione. Errori replicazione. Mutazioni. Siti AP. DNA glicosilasi. Danni indotti. Agenti alchilanti. Crosslink. Addotti grossolani. Intercalanti. Radiazioni UV. Dimeri pirimidina. Radiazioni ionizzanti. Meccanismi di riparazione. Geni di riparazione. Fotoriattivazione. Escissione di basi danneggiate. Metiltrasferasi. AP endonucleasi. MutL, Muts. Metilazione e riparazione. Riparazione post-replicativa.

Ricombinazione, trasposizione, riassortimento

Riparazione e ricombinazione. Tipi di ricombinazione. Modello di Holliday. Modello rotture a doppio filamento. Conversione genica. Proteine che intervengono nella ricombinazione. Ricombinazione sito specifica. Trasposoni. Trasposizione ed elementi ripetuti. Meccanismi di trasposizione. Trasposoni a DNA. Retrotrasposoni, retrovirus ed LTR. Trasposizione elementi LINE e SINE. Ricombinazione non omologa. Ricombinazione e origine variabilità immunoglobuline. Riassortimento di genomi virali.

La trascrizione

Reazione polimerizzazione RNA. Fasi trascrizione. Filamenti DNA codificante e stampo. Promotori e terminatori. Bolla trascrizione. RNA polimerasi batterica. Sito attivo RNA polimerasi. Fattori Sigma e Ciclo di sigma. Promotore batterico. Sequenze conservate nei promotori. Terminazione in procarioti. Terminazione Rho dipendente e rho indipendente. Antiterminazione. Controllo trascrizione negli eucarioti. RNA polimerasi eucariotiche. Geni trascritti. RNA polimerasi II. Promotori eucariotici. Fattori di trascrizione. Complesso di inizio. Complesso mediatore/attivatore. Sequenze enhancer e silencer. Regioni di controllo RNA polimerasi I, II e III. Terminazione in eucarioti. Inibitori della sintesi di RNA.

Maturazione dell'RNA

Vari tipi di RNA RNA precursore e tipi di maturazione. Struttura del tRNA. Maturazione tRNA. RNA ribosomale. Maturazione rRNA. Ribosomi procariotici ed eucariotici. Assemblaggio ribosomi nel nucleolo. RNA messaggero nei procarioti. Concetto di cistrone. Maturazione mRNA eucariotico. Capping. Poliadenilazione. Funzione cap e poliA. Dirottamento della traduzione. Gene intronico. Tipi di introni. Splicing introni di tipo I. Splicing introni di tipo II. Introne tRNA lievito. Rimozione degli introni da mRNA eucariotico. Proteine snRNP. Spliceosoma.

Codice Genetico

Trasferimento informazione genetica. Definizione di codice. Ipotesi adattatore. Decifrazione del codice. tRNA amminoacil sintetasi. Decifrazione del codice: esperimenti. Codoni per aminoacidi. Segnali di stop. Appaiamento codone-anticodone. Quadri di lettura aperti (ORF). Ridondanza e degenerazione del codice. Posizione vacillante. Universalità. Codice mitocondriale.



La traduzione

Caratteristiche generali e specificità. Differenze tra procarioti ed eucarioti. Fasi della traduzione. Amino-acil tRNA sintetasi. Attivazione degli aminoacidi. Struttura ribosomi procariotici ed eucariotici. Siti di legame e centri attivi nel ribosoma Codone d'inizio. Formilazione. Fattori di inizio. Complesso di pre-inizio. Sequenza Shine-Dalgarno e Kozak. Traslocazione. Peptidil trasferasi. Allungamento. Terminazione e rilascio. Fattori di rilascio. Poliribosom. Sintesi proteica negli eucarioti. Fattori di inizio eucariotici. Complesso di pre-inizio. Tu e complesso ternario. Inibitori della sintesi proteica.

Regolazione dell'espressione genica nei procarioti

Punti di controllo dell'espressione. Trascritto policistronico. Concetto di operone. promotore e operatore. Concetto di repressore ed attivatore. Regolazione negativa e positiva. Operone lattosio. Operone galattosio. Operone arabinosio. cAMP e proteina CAP. Operone triptofano. Attenuazione. Regolazione proteina p32. Operoni ribosomali. Controlli post-trascrizionali. Risposta stringente. RNA antisenso.

Regolazione dell'espressione genica negli eucarioti

Livelli di espressione. Punti di controllo. Tipi di controllo. Proteine che legano il DNA. Modelli strutturali. Elica-giro-elica ed elica-ansa-elica. Dita di zinco. Cerniera di leucine. Legame cooperativo. Attivatori e coattivatori. Promotori eucariotici. TATA-box binding protein. Enhancers. Silencers. Isolatori. Cromatina e trascrizione. Acetilazione e deacetilazione degli istoni. Rimodellamento della cromatina. Metilazione del DNA. Metilazione ed inattivazione nei vertebrati. Deamminazione citosina e doppietto CpG. Isole CpG. Siti ipersensibili alla DNasi. Regolazione del cluster globinico. Amplificazione: cromosomi politenici, oncogeni, DHFR e metotrexate.

Regolazione della trascrizione: ormoni tiroidei e steroidei, citochine, chemochine. Trasduzione del segnale. G-protein coupled receptors. Jak-Stat, NF-kB, fattori di crescita. Regolazione post-trascrizionale. Splicing alternativo. Esoni e domini proteici. Splicing alternativo. Rimescolamento esoni e significato evolutivo. Errori di splicing ed esempi di patologie correlate. Long non coding RNA. Trasporto mRNA: hnRNP e mRNP. Regolazione dell'espressione genica dei retrovirus.

Localizzazione degli mRNA. Cenni sulla regolazione dello sviluppo. Omeodomini e proteine omeotiche. Regolazione emivita mRNA. Esempi: tubulina, ferritina/transferrina. Stabilità della coda di poli-A: caseina. Deadenilazione e P bodies. RNA interference. siRNA e miRNA. Regolazione post-traduzionale. Proteolisi: maturazione proteine retrovirus. Coagulazione.

Modificazione e trasporto delle proteine

Ripiegamento funzionale della catena proteica. Chaperonine hsp60. Chaperonine hsp70. Proteasoma. Ubiquitine. Aggregati proteici. Amiloidosi e malattie da prioni. Destinazione delle proteine. Sequenze segnale. Trasporto citosol-nucleo. Trasporto citosol-mitocondrio. Trasporto citosol-reticolo endoplasmatico. Glicosilazione delle proteine. Legami disolfuro. Degradazione delle proteine non correttamente ripiegate.

Evoluzione molecolare

Ipotesi mondo a RNA. RNA come enzima. Ribozimi. Origine del DNA. Exon shuffling. Teoria esonica. Duplicazione dei geni. Elementi mobili. Genomi mitocondriali e cloroplastici. Virus ed evoluzione. Retrovirus endogeni. Sincizina.

DNA ricombinante

Concetto di DNA ricombinante. Trasformazione batterica. Coniugazione batterica. Infezione fagica e trasduzione. Vettori plasmidici. Vettori fagici e virali. Clonaggio. Enzimi di restrizione. Strategie di selezione: antibiotici e LacZ. Librerie genomiche. Cosmidi, BAC e YAC.

Sonde. Elettroforesi. Southern blot. Northern blot. Isolamento e retro trascrizione di mRNA eucariotico. Librerie di cDNA. Vettori di espressione. Sonde da sequenze proteiche. Studi di espressione mediante microarray.

Analisi proteine. SDS Page. Western blot. ELISA. Anticorpi monoclonali. Sequenziamento chimico. Sequenziamento enzimatico. Sequenziamento con fluorocromi. Pirosequenziamento. Next generation DNA sequencing. Sequenziamento genomi: shotgun e contig.

Polymerase Chain Reaction. Cloni genomici e di cDNA mediante PCR. Mutagenesi mediante PCR. Altre Real Time PCR. Applicazioni della PCR. Vettori di espressione. Espressione di proteine ricombinanti. Trasfezioni. Vettori virali. Etichettatura proteine (tag fluorescenti, 6His, immunologici). Insulina ricombinante. Vaccino ricombinante del virus dell'epatite B.



Cenni di terapia genica

Terapia genica: definizione e scopi. Vettori per la terapia genica. Principi. Geni reporter. iRNA nella terapia genica. Genome editing. Vettori adenovirali. Vettori retrovirali e lentivirali. Esempi di terapia genica: SCIS-ADA, beta-talassemia, distrofie, fibrosi cistica. Terapia genica e HIV. Il futuro della terapia genica.

Modalità d'esame

Prove scritte (una per Genetica Medica e Molecolare, una per Biologia Molecolare), che comprendono quiz a scelta multipla, domande aperte ed esercizi. Successive prove orali, previo superamento degli scritti, sugli argomenti del programma dei rispettivi moduli.

Testi consigliati

Biologia Molecolare (II edizione), Amaldi et al., Casa Editrice Ambrosiana

Genomi 3, T.A. Brown, EdiSES.

La cellula, un approccio molecolare, II edizione (III Edizione Italiana), Cooper et al, Piccin

Biologia molecolare del gene, V edizione. Watson et al, Zanichelli

Il Gene X, B. Lewin et al., Zanichelli

Biologia Molecolare, II edizione, R.F. Weaver, McGraw-Hill

Materiale didattico aggiuntivo (articoli scientifici recenti, generalmente in lingua inglese) forniti dal docente.

Ricevimento Studenti

Dalle 15 alle 19, previo appuntamento telefonico o via posta elettronica

Sede

Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento

Sezione Biologia e Genetica

Indirizzo Strada le Grazie 8

☎ 045-8027204 (studio), 045-8027205 (laboratorio)

Fax 045-8027180

e-mail: donato.zipeto@univr.it